

## ارتباط پلی مورفیسم های rs56232250 و rs56066773 از ژن FOXP3 واقع در جایگاه هدف microRNAs با بیماری آرتریت روماتوئید در بیماران مراجعه کننده به کلینیک امام علی (ع) شهرکرد

هاجر بهادیوند چگینی<sup>۱</sup>، بتول پورقصری<sup>۲\*</sup>، اعظم پوراحمدیان<sup>۲</sup>، صدیقه کاظمی<sup>۲</sup>، هدایت اله شیرزاد<sup>۳</sup>، محمد موسوی<sup>۴</sup>، فاطمه دریس<sup>۵</sup>

گروه ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۲</sup>مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۳</sup>مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۴</sup>گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۵</sup>گروه آمار، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۷

### چکیده:

**زمینه و هدف:** بیماری آرتریت روماتوئید یک بیماری خود ایمنی است که عملکرد یا تعداد سلولهای T تنظیمگر (Treg) دچار اختلال می شود. پروتئین FOXP3 از فاکتورهای اصلی در عملکرد Treg است. یکی از عواملی که بر بیان ژن FOXP3 دخالت دارند microRNA ها هستند که به نواحی 3'UTR جفت می شوند. تغییر یک نوکلئوتید در توالی جایگاه هدف microRNA می تواند تنظیم microRNA را تحت تأثیر قرار دهد. پلی مورفیسم های rs56232250 و rs56066773 که در 3'UTR ژن FOXP3 قرار دارند، می توانند با ایجاد جایگاه برای microRNA با بیماری آرتریت روماتوئید در ارتباط باشند. در این مطالعه ارتباط این ۲ پلی مورفیسم با بیماری آرتریت روماتوئید بررسی شده است.

**روش بررسی:** در این مطالعه مورد-شاهدی از میان بیماران مراجعه کننده به بخش روماتولوژی کلینیک امام علی (ع)، ۹۸ فرد مبتلا به آرتریت روماتوئید به عنوان گروه بیمار و ۱۲۴ فرد سالم به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. پلی مورفیسم های rs56232250 و rs56066773 که در 3'UTR ژن FOXP3 قرار گرفته اند و با روش PCR-RFLP بررسی شدند. نتایج به دست آمده از تعیین این ۲ ژنوتیپ با نرم افزار SPSS و آزمون کای دو تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته ها:** در جمعیت مورد مطالعه، فراوانی پلی مورفیسم rs56066773 در بیماران و گروه کنترل به ترتیب ۳/۱ و ۱/۶٪ و فراوانی پلی مورفیسم rs56232250 در بیماران و گروه کنترل به ترتیب ۱ و ۱/۶٪ بود. هیچ ارتباط معنی داری بین آن ها و بیماری یافت نشد.

**نتیجه گیری:** با وجود اینکه ارتباط معنی داری بین این ۲ پلی مورفیسم و بیماری آرتریت یافت نشد؛ ولی در مطالعه های پیشین ارتباط بین پلی مورفیسم های واقع در جایگاه هدف microRNA با تعدادی از بیماری ها ثابت شده است؛ بنابراین لازم است که سایر پلی مورفیسم های 3'UTR ژن FOXP3 مورد بررسی قرار گیرد.

**واژه های کلیدی:** پلی مورفیسم، FOXP3، microRNA، آرتریت روماتوئید.

### مقدمه:

مردان است (۲). در مفاصل ملتهب جمعیت هتروژنی از سلول ها و مدياتورهای محلول سیستم ایمنی مانند ماکروفاژها، لنفوسیت های B، T و سیتوکاین ها تجمع

آرتریت روماتوئید بیماری سیستمیک مزمنی است که حدود ۱٪ جمعیت دنیا به آن مبتلا می شوند (۱). شیوع آرتریت روماتوئید در زنان ۳-۵٪ برابر بیش تر از

می کنند. لازم به ذکر است که یکی از دلایل اصلی برای این بیماری وجود سلول های T کمکی ۱۷ (Th17) است که در طی روند بیماری فعال شده و در سینوویوم مفاصل ملتهب تجمع می نمایند و در نتیجه سبب تداوم التهاب و در نهایت آسیب بافتی می گردند. Th17 از طریق ترشح اینترلوکین ۱۷ (IL17) نقش خود را ایفا می کند (۳). اینترلوکین ۱۷ با القای تولید IL-6، IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  در سلول های اپیتلیال، اندوتلیال و نیز انواع سلول های دیگری همچون کراتینوسیت ها، سینوویوسیت ها، فیبروبلاست ها و ماکروفاژها باعث تقویت پاسخ های التهابی می شوند (۴). تعدیل پاسخ لنفوسیت TH17 به طور عمده مرتبط با سلول های CD4+CD25+FOXP3+Treg است. این سلول ها زیر گروهی از سلول های T کمکی (Th) می باشند که در هموستازی سیستم ایمنی نقش غیر قابل انکاری دارند. نقش سلول های Treg در ایجاد بیماری آرتریت روماتوئید ثابت شده است. در مطالعات اخیر نشان داده شده است که در بیماران آرتریت روماتوئید عملکرد و یا تعداد سلول های Treg دچار نقص شده است (۵). مطالعه های بسیاری در این زمینه نشان داده است که سلول های Treg جدا شده از بیماران آرتریت روماتوئید به طور ناقص سایتوکاین پیش التهابی مثل TNF $\alpha$ ، IL17 و IFN $\gamma$  را سرکوب می کنند (۶). از عوامل تنظیم کننده کلیدی در تکامل و عملکرد سلول های Treg، فاکتور FOXP3 است (۷) که روی کروموزوم x واقع شده است (۸). FOXP3 یک فاکتور نسخه برداری است که نقش اصلی در کنترل هموستازی ایمنی به واسطه سلول های Treg دارد. عملکرد تنظیم گری FOXP3 ممکن است، مانع القاء پاسخ ایمنی علیه سرطان و عوامل عفونی شود. بیان FOXP3 در سلول های TCD<sup>4+</sup> یافت شده و برای شناسایی این سلول ها به عنوان سلول های Treg کافی است.

FOXP3 برای اختصاصیت و حفظ سلول های Treg ضروری است؛ و بنابراین آن به عنوان یک تنظیم گر اصلی (master regulator) تلقی می شود (۸). از عناصری که بر بیان ژن FOXP3 دخالت دارند.

microRNA ها هستند. مدتی است که مولکول های microRNA (RNA های کوچک غیر رمزگذار ۲۴-۱۸ نوکلئوتیدی) شناخته شده اند و از آن ها به عنوان یک بیومارکرهای (شناسه زیستی) برای بررسی و تشخیص سرطان ها استفاده می کنند (۹). نقش اساسی microRNA ها در تغییرات پس از رونویسی و کنترل بیان ژن است (۱۰).

مطالعه های اخیر نقش های microRNA ها را در تکامل تمایز، آپوپتوز و تکثیر نشان می دهند. microRNA ها یا به طور کامل به mRNA هدف متصل شده و باعث تخریب آن می شوند، یا به طور ناقص همپوشانی دارند که تنها از ترجمه پروتئین مورد نظر جلوگیری می کنند (۱۱). microRNA ها اغلب به نواحی 3'UTR mRNA هدف شان جفت می شوند. تغییر یک نوکلئوتید مثل SNP ها در توالی جایگاه هدف microRNA می تواند عملکرد تنظیمی microRNA ها و به دنبال آن بیان ژن را تحت تأثیر قرار دهد. پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNP) به طور طبیعی در جایگاه هدف رخ می دهند. حدود ۲۵۰ نوع SNP به طور بالقوه جایگاه هدف جدید برای microRNA ها ایجاد می کند (۱۲). بیش از ۳۰٪ ژن های کدکننده پروتئین به وسیله microRNA تنظیم می شوند. این نشان دهنده این است که microRNA یک نقش حیاتی در عملکردهای بیولوژیکی دارد (۱۵-۱۳).

منطقه حیاتی در اتصال microRNA به جایگاه هدف در 3'UTR mRNA، در انتهای 5' (منطقه seed که حدود ۷-۲ نوکلئوتید دارد) microRNA قرار دارد (۱۸-۱۵). مطالعه های اخیر ثابت کرده است که یک تک جهش در منطقه seed، می تواند اتصال microRNA به جایگاه هدف را از بین ببرد (۱۹). تاکنون مطالعه در مورد ارتباط پلی مورفیسم های 3'UTR ژن FOXP3 و بیماری آرتریت روماتوئید انجام نشده است؛ لذا پژوهش حاضر ارتباط پلی مورفیسم های rs56066773 و rs56232250 که در 3'UTR ژن FOXP3 واقع شده اند را در بیماران آرتریت روماتوئید مورد بررسی قرار داده است.

## روش بررسی:

جامعه آماری این مطالعه تحلیلی- مشاهده ای (از نوع موردی- شاهدی) شامل ۹۸ فرد بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید (۹۰ زن و ۸ مرد) و ۱۲۴ فرد سالم (۱۲۱ زن و ۳ مرد) به عنوان گروه شاهد است. بیماری افراد بیمار توسط پزشک متخصص روماتولوژی (بر اساس نتایج آزمایش ها) تأیید گردید. گروه شاهد فاقد سابقه بیماری های اتوایمیون می باشند و همچنین جمعیت مورد از افراد مراجعه کننده به بخش روماتولوژی کلینیک امام علی (ع) شهرکرد بودند. انجام مطالعه با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد بوده است و از کلیه شرکت کنندگان در مطالعه رضایت نامه کتبی گرفته شده است.

DNA ژنومی از نمونه های خون حاوی ضد انعقاد EDTA با روش استاندارد فنل و کلروفرم استخراج گردیده و DNA استخراج شده در ۲۰- درجه سانتی گراد تا انجام آزمایش PCR ذخیره شد. برای حصول یک نتیجه ی موفق از انجام PCR، نیاز به DNA خالص، شرط انکار ناپذیری است. از این رو جهت بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد.

تعیین ژنوتیپ با استفاده از روش PCR-RFLP صورت گرفت. آغازگرهای مناسب برای هر پلی مورفیسم طراحی شد و سپس واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) برای هر جفت آغازگر بهینه سازی شد.

مواد لازم جهت انجام واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی

(۱۰۰ نانوگرم)، ۲ میکرولیتر بافر X10، ۰/۴ میکرولیتر  $\text{mgCl}_2$ ، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۴۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر هر جفت آغازگر رفت و برگشت (۱۰ پیکومول)، ۰/۱ میکرولیتر Taq پلی مرز (kabc) بود. مراحل انجام آزمایش به ترتیب زیر بر روی نمونه های گروه بیمار و شاهد انجام شد. پس از واسرشت شدند. در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قطعات DNA برای پلی مورفیسم rs56066773 در ۳۵ چرخه (۹۵ درجه سانتی گراد ۳۵ ثانیه، ۶۷ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه) و برای پلی مورفیسم rs56232250 پس واسرشت شدند در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه در ۳۵ چرخه (۹۵ درجه سانتی گراد ۳۵ ثانیه، ۶۶/۵ درجه سانتی گراد ۳۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه) تکثیر یافتند. در نهایت یک مرحله نهایی طویل سازی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. صحت انجام واکنش پلی مرز (PCR) بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ تأیید شد. RFLP بر روی محصول PCR برای هر دو پلی مورفیسم rs56066773 و rs56232250 به ترتیب توسط آنزیم محدودالایر Taq1 و Hinf1 مطابق دستور شرکت (Takara) تولید کننده آنزیم انجام گرفت؛ سپس قطعات حاصل از RFLP بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ الکتروفورز شد و قطعات حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل مشاهده گردید (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: توالی آغازگرها، محصول PCR و RFLP پلی مورفیسم های rs56066773، rs56232250

پلی مورفیسم	توالی آغازگرها	محصول PCR	آنزیم محدود الاثر	محصول RFLP (bp)
rs56066773	F. 5' GACCTCAAGATCGAGGAAAGG -3' R. 5' CTTGGGGCAAAGGATATGATCG-3'	196 bp	Taq 1	185/11: عدم وجود SNP 163/22/11: وجود SNP
rs56232250	F. 5' CATCATCACACAATCACACACAAGC-3' R. 5' GGGACCTCAGATCCTGAGGGTAC-3'	246 bp	Hinf 1	202/44: عدم وجود SNP 186/44/16: وجود SNP

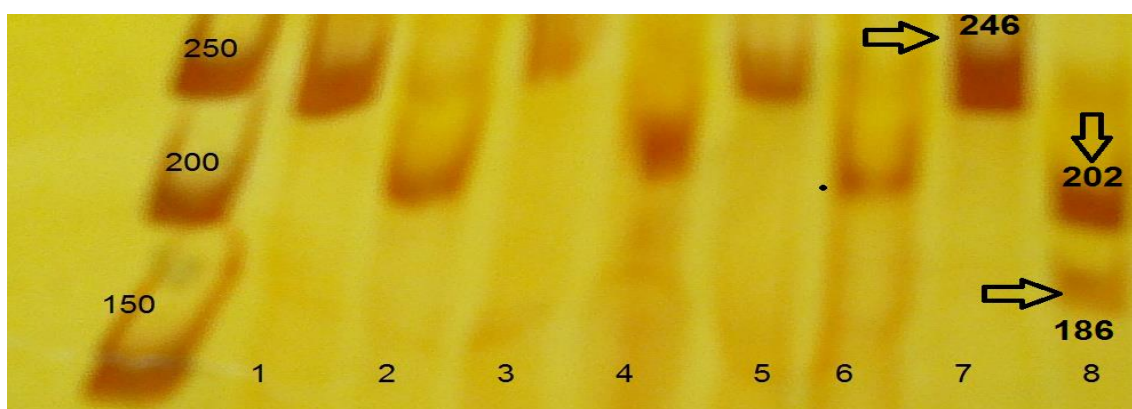
ارزیابی نتایج فراوانی ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم ها توسط نرم افزار SPSS و آزمون کای دو انجام گرفت.  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

زن ۹۰ نفر (۹۱/۸٪) و در جمعیت شاهد تعداد زن ۱۲۱ نفر (۹۷/۵٪) و تعداد مرد ۳ نفر (۲/۴٪) بود. بین کنترل و بیمار تفاوت معنی داری از نظر سن و جنس وجود نداشت.

### یافته ها:

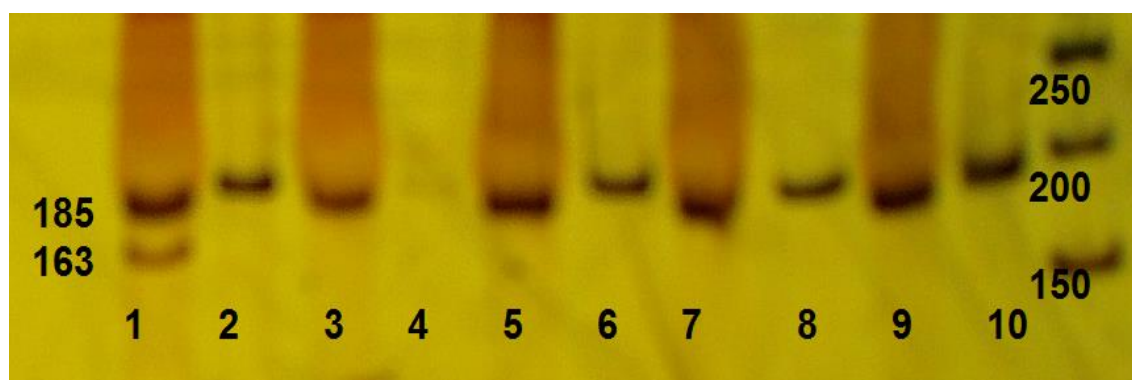
مشخصات افراد مورد مطالعه به این ترتیب بود. در جمعیت بیمار تعداد مرد ۸ نفر (۸/۱٪)، تعداد

تعیین ژنوتیپ در هر ۲ گروه مورد مطالعه به طور موفقیت آمیزی انجام گردید (تصویر شماره ۱ و ۲) و نتایج با بررسی تعیین توالی محصولات PCR تأیید شد.



**تصویر شماره ۱: ژنوتیپ پلی مورفیسم rs56232250 توسط روش PCR-RFLP**

نمونه های شماره ۱، ۳، ۵ و ۷ محصول PCR و نمونه های ۲، ۴، ۶ و ۸ به ترتیب فرآورده حاصل از برش آنزیمی همان محصولات است. در محصول PCR یک قطعه ۲۴۶bp وجود دارد که پس از برش توسط آنزیم *HinfI* در جایگاه کنترل مثبت، به یک قطعه ۲۰۲bp و یک قطعه ۴۴bp تبدیل می شود. در صورت وجود پلی مورفیسم قطعات ۱۸۶bp، ۴۴bp و ۱۶bp به وجود می آید. نمونه شماره ۸ حالت هتروزیگوت را نشان می دهد.



**تصویر شماره ۲: تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم rs56066773 توسط روش PCR-RFLP**

نمونه های شماره ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ فرآورده PCR و شماره های ۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ به ترتیب حاصل هضم آنزیمی همان نمونه هاست. در فرآورده PCR یک قطعه ۹۶bp وجود دارد که در کنترل پس از هضم آنزیمی به قطعات ۱۸۵bp و ۱۱bp تبدیل می شود. در صورت وجود پلی مورفیسم قطعات ۱۶۳bp، ۲۲bp و ۱۱bp به وجود می آید. نمونه ۱ حالت هتروزیگوت را نشان می دهد.

فراوانی آلل و ژنوتیپ در بیماران و گروه کنترل مقایسه و محاسبه گردید. فراوانی آللی برای هر ۲ پلی مورفیسم در جدول شماره ۲ ارائه شده است که بر طبق این جداول فراوانی آللی G و A در پلی مورفیسم rs56066773 در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید به ترتیب ۹۸/۴۷٪ و ۱/۵۳٪ و در گروه کنترل این فراوانی با ۹۹/۲٪ و ۰/۸٪ بود (جدول شماره ۲).

### جدول شماره ۲: فراوانی آللی در پلی مورفیسم های مورد مطالعه

فراوانی آللی	کنترل	بیمار
G (rs56066773)	۹۹/۲٪	۹۸/۴۷٪
A	۰/۸٪	۱/۵۳٪
G (rs56232250)	۹۹/۲٪	۹۹/۵٪
A	۰/۸٪	۰/۵٪

فراوانی آلل G و A در پلی مورفیسم rs56232250 در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید به

ترتیب ۹۹/۵ درصد و ۰/۵ درصد و در گروه کنترل این فراوانی با ۹۹/۲ درصد و ۰/۸ درصد بود (جدول ۲). در پلی مورفیسم rs56066773 فراوانی ژنوتیپ GG در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید ۹۶/۹٪ و در افراد سالم ۹۸/۴٪، فراوانی ژنوتیپ AG در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید ۳/۱٪ و در افراد سالم ۱/۶٪ گزارش شده است، فراوانی ژنوتیپ AA در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید و افراد سالم مشاهده نگردید. بین ۲ گروه از نظر فراوانی ژنوتیپ GG و AG اختلاف معنی داری مشاهده نگردید ( $P>0/05$ ) (جدول شماره ۳). در پلی مورفیسم rs56232250 فراوانی ژنوتیپ GG در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید ۹۹٪ و در افراد سالم ۹۸/۴٪، فراوانی ژنوتیپ AG در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید ۱٪ و در افراد سالم ۱/۶٪ گزارش شده است، فراوانی ژنوتیپ AA در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید و افراد سالم مشاهده نگردید. بین ۲ گروه از نظر فراوانی ژنوتیپ AA و AG اختلاف معنی داری مشاهده نگردید ( $P>0/05$ ) (جدول شماره ۴).

### جدول شماره ۳: فراوانی ژنوتیپی در پلی مورفیسم rs56066773

P	نسبت خطر (فاصله اطمینان)	بیمار		فراوانی ژنوتیپ
		تعداد (درصد)	کنترل	
	۰/۵۱۹ (۰/۰۸۵-۳/۱۶۹)	۹۵ (۹۶/۹)	۱۲۲ (۹۸/۴)	GG
۰/۶۵۷	۱/۹۲۶ (۰/۳۱۶-۱۱/۷۶)	۳ (۳/۱)	۲ (۱/۶)	AG
-	-	۰	۰	AA

### جدول شماره ۴: فراوانی ژنوتیپی در پلی مورفیسم rs56232250

P	نسبت خطر (فاصله اطمینان)	بیمار		فراوانی ژنوتیپ
		تعداد (درصد)	کنترل	
	۱/۵۹۰ (۰/۱۴۲-۱۷/۷)	۹۷ (۹۹)	۱۲۲ (۹۸/۴)	GG
۱/۰۰۰	۰/۶۲۹ (۰/۰۵۶-۷/۰۳۸)	۱ (۱)	۲ (۱/۶)	AG
-	-	۰	۰	AA

## بحث:

توالی یابی ژنوم انسان نشان داده است که تشابه ژنوم ۳ میلیارد جفت بازی در افراد مختلف ۹۹/۹٪ است. به عبارت دیگر هر فردی به طور متوسط ۰/۱٪ از لحاظ ژنتیکی از سایر افراد کره زمین متفاوت می باشند. در این تفاوت ۰/۱٪ رازی وجود دارد که توضیح می دهد چرا بعضی افراد به برخی بیماری های خاص مستعدتر می باشند، یا چرا با احتمال بیش تری نسبت به سایر افراد جمعیت سالم می مانند. افزایش آگاهی ما از تغییرات ژنتیکی در SNPs در کنار فناوری های تعیین ژنوتیپ SNP به صورت موازی و پربازده است (۲۰). microRNA به عنوان یک تنظیم گر مهم بعد نسخه برداری عمل می کنند (۲۱). تغییر یک نوکلئوتید در سکانس جایگاه هدف می تواند تنظیم microRNA را تحت تأثیر قرار دهد (۱۲).

تعداد زیادی از توالی های هدف microRNA پلی مورفیک هستند و اغلب این پلی مورفیسم ها فراوانی نسبتاً بالایی در جمعیت های مختلف انسانی دارند و صرفنظر از اثرشان (نفع، ضرر، خنثی) بیان ژن را تحت تأثیر قرار می دهند (۱۲).

تغییر در توانایی اتصال microRNA به جایگاه هدف که در اثر پلی مورفیسم های خاص ایجاد شده است، منجر به تفاوت در ابتلای به بیماری های مختلف مرتبط با ژنتیک می شود که می توان به پلی مورفیسم rs334348 در جایگاه هدف miR-367 و ارتباط این SNP با خطر افزایش سرطان سینه و نیز استعداد ابتلای به عفونت HIV با یک پلی مورفیسم در 3'UTR ژن NLPR3 و کاهش در عملکرد miR-34 در اثر یک SNP در ژن a+syn و ابتلا به بیماری پارکینسون اشاره کرد (۲۴-۲۲). افزایش بالا miR-146 در بیماری آرتریت روماتوئید ثابت شده است. در مطالعه ای ۲ پلی مورفیسم واقع در ژن هدف miR-146 (IRAK) در بیماران آرتریت روماتوئید

مورد بررسی قرار گرفته اند. نتایج حاصل از این مطالعه تفاوت معنی داری بین این ۲ پلی مورفیسم و بیماری آرتریت روماتوئید نشان داده است (۲۵). ارتباط بیان ژن FOXP3 و به دنبال آن میزان این پروتئین و خطر بروز بیماری آرتریت روماتوئید در مطالعات زیادی به اثبات رسیده است. در بیماران آرتریت روماتوئید میزان پروتئین FOXP3 به میزان قابل توجهی پایین است. یکی از عواملی که منجر به کاهش بیان این پروتئین می شود مولکول های microRNA هستند. همان طور که ذکر شد، پلی مورفیسم در منطقه اتصال microRNA به ژن هدف (3'UTR) می تواند باعث ایجاد منطقه جدید و یا از بین بردن منطقه اتصال microRNA به ژن هدف شود. ۲ پلی مورفیسم rs56232250 و rs56066773 که بر اساس بررسی بانک های اطلاعاتی مختلف بیش ترین جایگاه را برای microRNA ها ایجاد می کند و به دنبال آن باعث سرکوب ژن FOXP3 می شود، در مطالعه ما جهت بررسی انتخاب گردید. با این حال نتایج آماری این مطالعه اختلاف معنی داری بین پلی مورفیسم های rs56232250 و rs56066773 و خطر ابتلا به آرتریت روماتوئید نشان نداد. این ۲ پلی مورفیسم برای اولین بار است که مورد بررسی قرار می گیرند و بنابراین مطالعه ای جهت مقایسه در دست نیست.

ارتباط این ۲ پلی مورفیسم با سایر بیماری های خود ایمنی هنوز مورد مطالعه قرار نگرفته است، اما نتایج این مطالعه با سایر مطالعاتی که در حوزه پلی مورفیسم های ناحیه 3'UTR و ارتباط آن با بیماری انجام شده است، همسویی را نشان نمی دهد. ممکن است پلی مورفیسم های دیگری در این ناحیه از ژن FOXP3 با بیماری آرتریت روماتوئید در ارتباط باشد که باید در مطالعات دیگر مورد بررسی قرار گیرد. از طرف

پلی مورفیسم های جایگاه هدف microRNA در  
FOXP3 را جست و جو نماید.

دیگر پلی مورفیسم های مورد مطالعه ممکن است با  
بیماری های خود ایمنی دیگری ارتباط داشته باشد  
که هنوز بررسی نشده اند.

### تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از اساتید گروه ایمنی شناسی و  
همچنین همکاران مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی که  
در اجرای این پژوهش یاری نمودند، تشکر و قدردانی  
می گردد. این پژوهش حاصل پایان نامه ی کارشناسی  
ارشد است که با کد ۱۸۹۴-۷۴-۰۱-۱۳۹۲ در زمستان  
۹۲ تأیید گردید. هزینه اجرای این پژوهش توسط  
دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تأمین گردید.

### نتیجه گیری:

هرچند در مطالعه ما SNP های از FOXP3  
مورد مطالعه قرار گرفت که می تواند برای microRNA  
جایگاه هدف ایجاد کند، اما ارتباطی بین این  
پلی مورفیسم ها و بیماری آرتریت روماتوئید یافت نشد.  
با توجه به جوان بودن مطالعات مربوط به microRNA  
بررسی های بیش تر و گسترده تری لازم است تا بتواند

### منابع:

1. Dowman B, Campbell RM, Zgaga L, Adeloye D, Chan KY. Estimating the burden of rheumatoid arthritis in Africa: A systematic analysis. *J Glob Health*. 2012; 2(2): 020406.
2. Goldblatt F, Isenberg DA. New therapies for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2005; 140(2): 195-204.
3. Shen H, Goodall JC, Hill Gaston JS. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009; 60(6): 1647-56.
4. Waite JC, Skokos D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int J Inflam*. 2012; 8(19): 46-7.
5. Boissier MC, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2009; 76(1): 10-4.
6. Smigielska-Czepiel K, van den Berg A, Jellema P, van der Lei RJ, Bijzet J, Kluiver J, et al. Comprehensive analysis of miRNA expression in T-cell subsets of rheumatoid arthritis patients reveals defined signatures of naive and memory Tregs. *Genes Immun*. 2014; 15(2): 115-25.
7. Olson BM, Sullivan JA, Burlingham WJ. Interleukin 35: a key mediator of suppression and the propagation of infectious tolerance. *Front Immunol*. 2013; 4: 315.
8. Lozano T, Casares N, Lasarte JJ. Searching for the Achilles Heel of FOXP3. *Front Oncol*. 2013; 3: 294.
9. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435(7043): 834-8.
10. Aggarwal BB, Vijayalekshmi R, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res*. 2009; 15 (2): 425-30
11. Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*. 2006; 25(46): 6188-96.
12. Saunders MA, Liang H, Li W-H. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104(9): 3300-5.
13. Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, Lim LP, et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*. 2005; 310(5755): 1817-21.
14. Sethupathy P, Corda B, Hatzigeorgiou AG. TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. *RNA*. 2006; 12(2): 192-7.
15. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005; 433(7027): 769-73.

16. Smalheiser NR. EST analyses predict the existence of a population of chimeric microRNA precursor-mRNA transcripts expressed in normal human and mouse tissues. *Genome Biol.* 2003; 4(7): 403.
17. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 2004; 10(12): 1957-66.
18. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004; 23(20): 4051-60.
19. Georges M, Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Hiard S, et al. Polymorphic microRNA-target interactions: a novel source of phenotypic variation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2006; 71: 343-50.
20. Turnpenny PD, Ellard S. *Emery's elements of medical genetics*: Elsevier Health Sciences; 2011.
21. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004; 431(7006): 350-5.
22. Zhang L, Liu Y, Song F, Zheng H, Hu L, Lu H, et al. Functional SNP in the microRNA-367 binding site in the 3'UTR of the calcium channel ryanodine receptor gene 3 (RYR3) affects breast cancer risk and calcification. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(33): 13653-8.
23. Pontillo A, Brandao LA, Guimaraes RL, Segat L, Athanasakis E, Crovella S. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010; 54(3): 236-40.
24. Kabaria S, Choi DC, Chaudhuri AD, Mouradian MM, Junn E. Inhibition of miR-34b and miR-34c enhances alpha-synuclein expression in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 2015; 589(3): 319-25.
25. Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, Drosos AA. A polymorphism in the 3'UTR of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK1), a target gene of miR-146a, is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Joint Bone Spine.* 2010; 77(5): 411-3.



## **Association between rs56066773 and rs56232250 polymorphisms of FOXP3 gene in target site of microRNA with rheumatoid arthritis in patients referred to Emam Ali clinic of Shahrekord**

Bahadevand Chegini H<sup>1</sup>, Pourgheysari B<sup>2\*</sup>, Pourahmadian A<sup>2</sup>, Kazemi S<sup>2</sup>, Shirzad H<sup>3</sup>,  
Mousavi M<sup>4</sup>, Deris F<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Immunology Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>2</sup>Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran;

<sup>3</sup>Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>4</sup>Internal Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran;

<sup>5</sup>Statistics Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 1/Aug/2015      Accepted: 29/Sep/2015

**Background and aims:** Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease in which the number or function of regulatory T cells (Treg) is impaired. FOXP3 is one of the major factors of Treg function. Among the factors involved on FOXP3 expression are microRNAs (MIR) which bind to 3'UTR. A nucleotide substitution in the sequence of the target site of microRNA can affect the regulation of microRNA. Polymorphisms of rs56066773 and rs56232250 in the 3'UTR of gene FOXP3 can relate with rheumatoid arthritis through the target gene. This study was aimed to investigate the relationship between two polymorphisms with rheumatoid arthritis.

**Methods:** In this case-control study, 98 RA patients were recruited from Emam Ali rheumatology clinic and 124 healthy individuals (without the negative history of autoimmune diseases) served as control. Rs56066773 and rs56232250 polymorphisms in the 3'UTR of FOXP3 gene were investigated with Polymerase Chain Reaction (PCR)-Restricted Fragment Length Polymorphism (RFLP). The data were analyzed using SPSS.

**Results:** In the study population, the frequency of the A/G in rs56066773 in patients and control was 3.1 and 1.6%, respectively. The frequency of the same genotype in rs56232250 was 1 and 1.6% in patients and controls respectively. It was not found any significant relationship between two polymorphism and disease.

**Conclusion:** Although not found a significant relationship between polymorphisms and arthritis, previous studies has been established the relationship between polymorphisms in the microRNA target site with a number of diseases. Therefore, it is necessary to examine other FOXP3 gene 3'UTR polymorphisms.

**Key words:** Polymorphism, FOXP3, MicroRNA, Rheumatoid arthritis.

**Cite this article as:** Bahadevand Chegini H, Pourgheysari B, Pourahmadian A, Kazemi S, Shirzad H, Mousavi M, Deris F. Association between rs56066773 and rs56232250 polymorphisms of FOXP3 gene in target site of microRNA with rheumatoid arthritis in patients referred to Emam Ali clinic of Shahrekord. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(1): 9-17.

---

**\*Corresponding author:**

Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00989133031381, E-mail: bat238@yahoo.com